

3 MATERIAL UND METHODEN

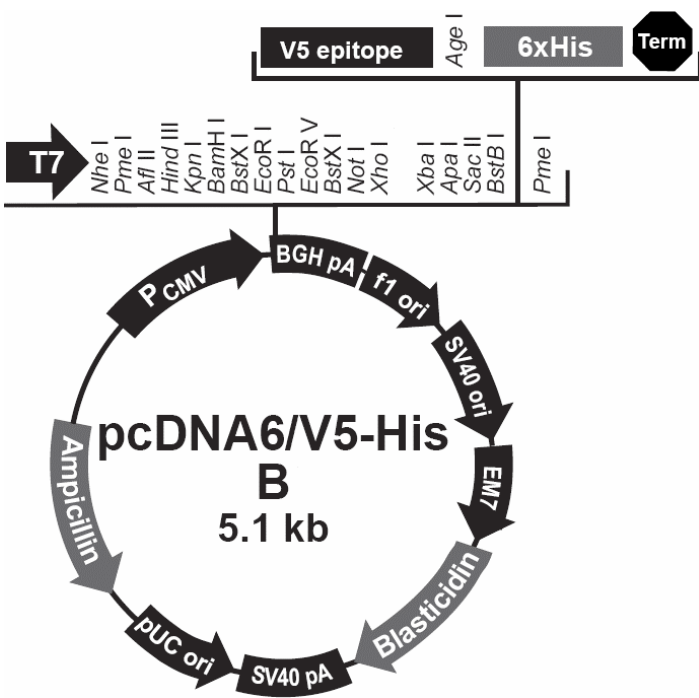
3.1 MATERIAL

3.1.1 Zelllinie HEK293T

Die Zelllinie HEK293T ist eine humane embryonale Nierenepithelzelllinie. HEK293T Zellen sind Derivate der Zelllinie HEK293, in deren Genom das temperatursensitive Gen »Large T Antigen« des »Simian Virus 40 (SV40)« integriert wurde. Aufgrund ihrer stabilen Expression des »SV40 Large T Antigen« zeichnen sich diese Zellen durch eine besonders gute Transfizierbarkeit aus. Plasmide, die eine SV40-kodierende Sequenz enthalten, werden in einer HEK293T Zelle 400- bis 1000-fach repliziert und weisen somit eine höhere Expressionsrate auf (Pear, Nolan et al. 1993).

3.1.2 Basisplasmide und cDNA-Plasmid-Konstrukte (»Plasmide«)

3.1.2.1 Basisplasmide

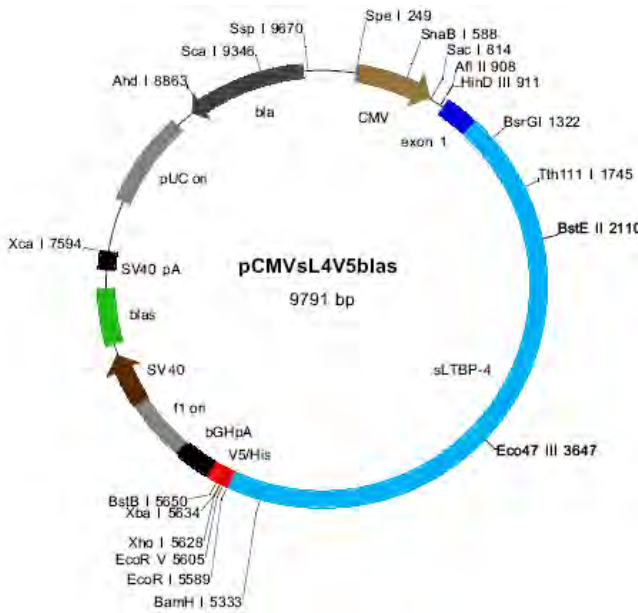
Name und Vektorkarte	Herkunft und Beschreibung
<p>pcDNA6/V5-His B</p> 	<p>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</p> <ul style="list-style-type: none"> • CMV promotor: bases 209-863 • T7 promotor priming site: bases 863-882 • Multiple cloning site: bases 895-1008 • V5 epitope: bases 1009-1050 • Polyhistidine tag: bases 1060-1077 • BGH reverse priming site : bases 1100-1117 • BGH polyadenylation sequence : bases 1103-1330 • F1 origin : bases 1376-1804 • SV40 promoter and origin : bases 1832-2139 • EM7 promoter : bases 2187-2242 • Blastidicin resistance gene (ORF) : bases 2261-2659 • SV40 early polyadenylation sequence : bases 2817-2947 • pUC origin : bases 3330-4003 • Ampicillin resistance gene (ORF) : bases 4148-5008

3.1.2.2 cDNA-Plasmid-Konstrukte

Name und Vektorkarte	Herkunft und Beschreibung
----------------------	---------------------------

pCMVsL4V5blas

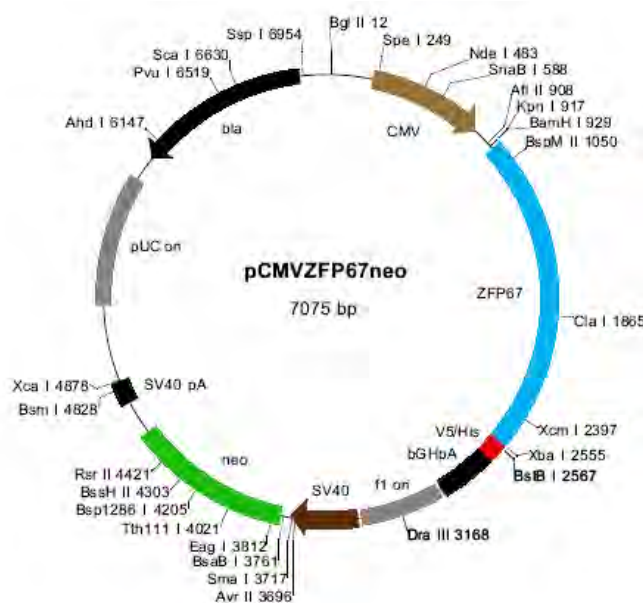
Dr. Joachim Altschmied,
 Institut für Molekulare Hämatologie
 J.W.Goethe Universität, Frankfurt am Main



- CMV promoter: bases 232-819
- LTBP-4 short form coding region: bases 922-5586
- Exon 1 LTBP-4 short form: bases 922-1170
- V5/His tag: bases 5587-5727
- Bovine growth hormone polyA: bases 5737-6008
- F1 origin: bases 6023-6451
- SV promoter: bases 6456-6799
- EM7 promoter: bases 6834-6889
- Blasticidin resistance gene coding region: bases 6908-7306
- SV40 early polyA: bases 7464-7594
- pUC origin: bases 7977-8650
- bla gene (ampicillin resistance) : bases 8795-9655

pCMVZFP67neo

Dr. Joachim Altschmied,
 Institut für Molekulare Hämatologie
 J.W. Goethe Universität, Frankfurt am Main

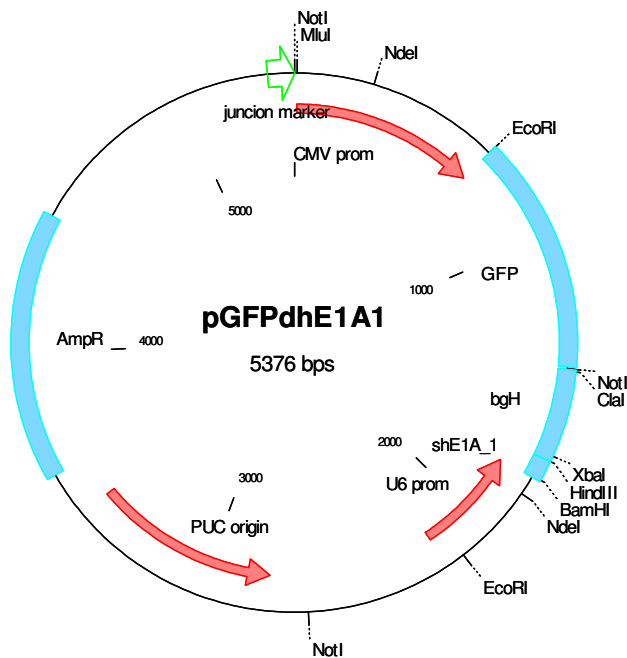


- CMV promoter: bases 232-819
- ZFP67 coding region: bases 938-2554
- V5/His tag: bases 2555-2645
- Bovine growth hormone polyA: bases 2654-2925
- F1 origin: bases 2940-3368
- SV40 early promoter: bases 3373-3716
- Neomycin resistance gene coding region: bases 3778-4572
- SV 40 early polyA: bases 4748-4878
- pUC origin: bases 5261-5934
- bla gene (ampicillin resistance): bases 6939-6079

Name und Vektorkarte

Herkunft und Beschreibung

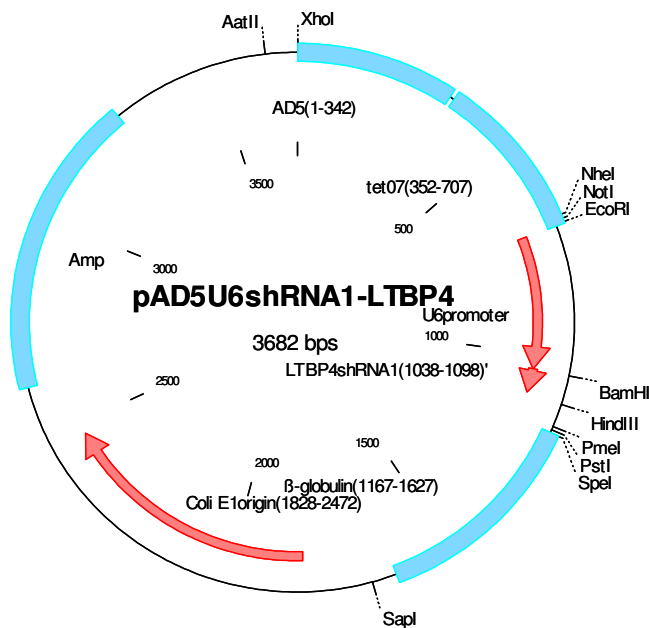
pGFPdhE1A1



Dr. vet. med. Henry Fechner,
 Institut für Kardiologie und Pulmonologie
 Charité-Universitätsmedizin Berlin
 Campus Benjamin Franklin
 Hindenburgdamm 30
 12200 Berlin

- CMV promoter: bases 9-677
- GFP Protein: bases 677-1421
- bgH: bases 1429-1722
- shRNAE1A_1-nicht funktionell: bases 1723-1791
- U6promoter: bases 2178-1791
- pUC origin: bases 3443-2775
- Ampicillin Resistenz Gen: bases: 3593-4450

pAD5U6shRNA1-LTBP4



Dr. vet. med. Henry Fechner,
 Institut für Kardiologie und Pulmonologie
 Charité-Universitätsmedizin Berlin
 Campus Benjamin Franklin
 Hindenburgdamm 30
 12200 Berlin

- Adenoviraler 5' ITR: bases 1-342
- tet07 (Regulierung der Virus DNA): bases 352-707
- U6promoter (RNA Polymerase III Promoter): bases 707-1038
- LTBP4shRNA1 (LTBP4shorthairpinRNAKassette): bases 1038-1098
- beta-globulin poly A signal: bases 1167-1627
- Coli-Origin-Replikon: bases 1828-2472
- Ampicillin Resistenz Gen: bases 2618-3270

3.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 1 Übersicht über die in der quantitativen real-time PCR und zur Sequenzierung verwendeten Primer

Referenzgen	GenBank Accession No.	Primerpaar	Sequenz	Genposition	Annealing Temperatur
β-Actin	U39357	bAct ov 549-568 s bAct ov 620-639 as	5'-CGACCTGACCGACTACCTCA-3' 5'-TTTGATGTACAGCACGATTT-3'	549-568 620-639	58 °C
ATP5B	NM_001686	A5B hu 1369-1389 s A5B hu 1535-1555 as	5'-GCACGGAAAATACAGCGTTT-3' 5'-TTGCCACAGCTTCTTCAATG-3'	1369-1389 1535-1555	60 °C
HPRT	NM_000194	HPRT hu 147-167 s HPRT hu 318-338 as	5'-TGCTCGAGATGTGATGAAGG-3' 5'-TCCCCTGTTGACTGGTCATT-3'	147-167 318-338	58 °C
RPL32	XM_540107	RP32 hu 163-183 s RP32 hu 323-343 as	5'-ATGCCCAACATTGGTTATGG-3' 5'-CTCTTTCCACGATGGCTTTG-3'	163-183 323-343	61 °C
GOI	GenBank Accession No.	Primerpaar	Sequenz	Genposition	Annealing Temperatur
LTBP-4	NM_003573	L4 133-153 s L4 217-237 as	5'-CACGACTGTCAGCTGTGCTC-3' 5'-TTCGCAGGACCCATTA ACTC-3'	133-153 217-237	58 °C
TGF-β 1	NM_000660	T1 hu 995-1013 s T1 hu 1120-1138 as	5'-TGGACACGCAGTACAGCAA-3' 5'-ACAGCTGCTCCACCTTGG-3'	995-1013 1120-1138	60 °C
p21	NM_000389	p21 c 312-332 s p21 c 380-400 as	5'-ACCTCTCAGGGCCGAAAAC-3' 5'-TAGGGCTTCTCTTGGAGAA-3'	312-332 380-400	59 °C
c-myc	V00568	hCMYC 738-756 s hCMYC 795-814 as	5'-CACCACCAGCAGCGACTCT-3' 5'-CCTGCCTCTTTCCACAGAA-3'	738-756 795-814	62 °C

GOI = Gene Of Interest (zu untersuchendes Gen, Zielgen)

GenBank Accession No. = Registriernummer der Gensequenz bei NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Sequenz = Primer-Oligonukleotidsequenz

Genposition = Position des Primers im codierenden Bereich des Zielgens

Annealing Temperatur = Schmelztemperatur des Primers

s = sense

as = antisense

ATP5B = ATP Synthase, H⁺ transportierend, mitochondrialer F1 Komplex, beta-Polypeptid

HPRT = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

RPL32 = Ribosomales Protein L32

LTBP-4 = Latent TGF-β Binding Protein 4 (Splicevariante sLTBP-4)

TGF-β1 = Transforming Growth Factor beta 1

3.1.4 Kompetente Bakterien

Für die Anreicherung der Vektoren und cDNA-Konstrukte (siehe 3.2.1) kamen kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (EZ Competent Cells, Genotyp: F⁺::Tn10 (Tc^r proA⁺B⁺ lacI^q ZM15) rec A1 and A1 hsd R17 (r_{k12}⁻m_{k12}⁺) lac gln V44 thi-1 gyr A96 rel A1) aus dem Reaktionskit Qiagen PCR cloning plus Kit (20), Qiagen GmbH, Hilden, Artikelnummer: 231222) zum Einsatz.

3.1.5 Enzyme und Reaktionskits

3.1.5.1 Enzyme

- Complete Mini Protease Inhibitor Tablets, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Artikelnummer: 11 836 153 001
- Restriktionsenzym *EcoRI* mit Buffer Tango™, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Artikelnummer: ER0271
- Restriktionsenzym *HindIII* mit Buffer Tango™, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Artikelnummer: ER0501
- Restriktionsenzym *HincII* mit Buffer Tango™, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Artikelnummer: ER0491
- RNase-Free DNase Set (50), Qiagen GmbH, Hilden, Artikelnummer: 79254
- Trypsin-/EDTA Solution (10x), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Artikelnummer: T417

3.1.5.2 Reaktionskits

- Ambion RNA Ladder, Ambion (Europe) Inc., England, Artikelnummer: 7152
- BCA Protein Assay Reagent, Pierce Chemical Company, Rockford USA, Artikelnummer: 23225
- BCIP/NBT Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: 00-2209
- iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Artikelnummer: 107-8880
- iScript™cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Artikelnummer: 107-8890
- Novex® Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: LC6025
- Novex® DryEase Mini-Gel Drying System, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NI2387A
- NucleoBond® PC 500, Macherey–Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Artikelnummer: 740574
- Qiagen PCR cloning plus Kit (20), Qiagen GmbH, Hilden, Artikelnummer: 231222
- QIAquick PCR Purification Kit (50), Qiagen GmbH, Hilden, Artikelnummer: 28104
- RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Artikelnummer: 5065-4476
- RNeasy® Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Artikelnummer: 74104

3.1.6 Antikörper

Nach dem Western Blot Verfahren wurde zur Proteindetektion auf der Blotmembran der Antikörper »Anti-V5/AP-Antibody, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: 46-0287« verwendet.

3.1.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Agarose LE, Analytical Grade, Promega GmbH, Mannheim, Artikelnummer: V3121
- Ampicillin-Natriumsalz, Karl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: K 029.1
- Aqua purificata, Karl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 3255.1
- Calciumchlorid (CaCl_2), Karl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: A119.1
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Artikelnummer: D2650
- DPBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline), Cambrex Bio Science, Verviers Belgien, Artikelnummer: BE17-512F
- Dulbecco`s Modified Eagle Medium, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: 41965-039
- Einmal-Küvetten, Plastibrand®, 1,5 halbmikro, PMMA 12,5 x 12,5 x 45 mm, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Artikelnummer: 7591 15
- Eppendorf UVette®, 50-2000 μl , Eppendorf AG, Hamburg, Artikelnummer: 952 01 005-1
- Ethanol 100% reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 100986
- Ethidiumbromid 1%, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 80293812
- Fetales Kälberserum, Biochrom AG, Berlin, Artikelnummer: S 0115
- Filterpapier Whatman® Chromatography Paper 3MM CHR, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 0043.1
- Fotofilm Kodak Ektachrome 64T Professional, Kodak Limited, England, Artikelnummer: 364 4325
- Glutamin 200 mM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: 25030-024
- Glyceringelatine, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 740246419
- Glycerol, > 98%, wasserfrei, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 7530.1

- HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$, 238,31 g/mol), Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 9105.4
- Kaliumchlorid (KCl), Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 1.04933.0500
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 4871
- 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: 10787-018
- Konservierer für Wasserbäder, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 9025.1
- Kryoröhrchen, 1,2 ml, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: E 308.1
- LB-Agar (Luria/Miller), Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: X969.1
- LB-Medium (Luria/Miller), Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: X968.1
- 6x Loading Dye Solution, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Artikelnummer: RO611
- 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Artikelnummer: M-6250
- Methanol zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 106018
- Natrium- β -Glycerophosphat, Sigma, München, Artikelnummer: G9891
- Natriumchlorid (NaCl), Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 106404
- Natriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$), Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 6580
- Natronlauge 0,5 mol/l, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 9138
- Nonidet P-40 Substitute, Fluka, München, Artikelnummer: 74385
- Nuklease-freies Wasser, Promega GmbH, Mannheim, Artikelnummer: P 119C
- NuPAGE™ Antioxidant, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0005
- NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel 1,0mm X 15 well, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0303BOX
- NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0007
- NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0002
- NuPAGE™ Transfer Buffer (20X), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0006
- NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0009

- Page Ruler® Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Artikelnummer: SM0679
- Parafilm® M Verschlussfolie, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Artikelnummer: 701611
- Pasteurpipetten, 230 mm, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 4522
- PCR-Softtubes, 0,2 ml, farblos, Biozym, Hamburg, Artikelnummer: 711080
- Penicillin Streptomycin, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: 15140-122
- Peggold 1 kb DNA-Leiter, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Artikelnummer: 25-2030
- Pipettenspitzen, 10µl, 20-200µl, 1000µl, neoLab, Heidelberg, Artikelnummern: 7-1900, 7-1902, 7-1903
- Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Artikelnummer: P 7170
- Protran® Nitrocellulose Transfer Membranes, 102 x 133 mm, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: 0030.1
- QiaShredder™ (250) Qiagen GmbH, Hilden, Artikelnummer: 79656
- Reaktionsgefäße, 0,5ml, 1,5ml, 2ml, farblos, Eppendorf, Hamburg, Artikelnummern: 0030120-086, 0030120-088
- Röhrchen, 4 ml, 12,0 / 75 mm, steril, greiner bio-one, Essen, Artikelnummer: 115 261
- Roti®-Block 10X Konzentrat, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: A151.1
- Rotilabo®-Spritzenfilter steril, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikelnummer: P664.1
- Salzsäure 0,5 mol/l, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 9058
- Serologische Pipetten, Cellstar®, 5 ml / 10 ml / 25 ml, greiner bio-one, Essen, Artikelnummern: 606 180, 607 180, 608 180
- Spritzen, 20 ml, AMEFA Stahlwaren GmbH, Solingen, Artikelnummer: A-20-LN
- TAE Puffer, 10%, pH 8, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 106023
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 108382
- Tween 20, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnummer: 822184
- Zellkultur Flaschen, 75 cm², TPP AG, Trasadingen, Schweiz, Artikelnummer: 90076
- Zellkultur-Schalen, 96 x 21 mm, Biochrom AG, Berlin, Artikelnummer: P93100
- Zellkultur Testplatten 6, TPP AG, Trasadingen, Schweiz, Artikelnummer: 92006
- Zentrifugenröhrchen, 15 ml, TPP AG, Trasadingen, Schweiz, Artikelnummer: 91015
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml, TPP AG, Trasadingen, Schweiz, Artikelnummer: 91050

3.1.8 Angesetzte Lösungen und Puffer

Agarose-Gel 1%

- 1 g Agarose (siehe 3.1.7)
- 100 ml TAE Puffer (siehe 3.1.7)

Calciumchlorid (CaCl₂)-Lösung (0,25 M), steril filtriert

- 2,77 g Calciumchlorid (siehe 3.1.7)
- Aqua bidest. (ad 100 ml)

Einfriermedium für HEK293T Zellen

- 45 ml Fötale Kälberserum (siehe 3.1.7)
- 5 ml DMSO (siehe 3.1.7)

2x HBS (»Hydrogen Buffered Saline«), steril filtriert

- 280 mM bzw. 3273 mg Natriumchlorid (NaCl) (siehe 3.1.7)
- 50 mM bzw. 2383 mg HEPES (siehe 3.1.7)
- 1,5 mM bzw. 2,0 ml Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)-Lösung (s. u.)
- Aqua bidest. (ad 200 ml)
- NaOH für pH 7,1

Laufpuffer für Western Blot Applikationen

- 50 ml NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (siehe 3.1.7)
- 950 ml Aqua dest.

LB-Agar

- 40 g LB-Agar Trockenmedium (siehe 3.1.7)
- 1000 ml Aqua dest.

LB-Agar mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml Ampicillin)

- 200 ml LB-Agar (s. o.)
- 20 mg / ml Ampicillin-Stammlösung, steril filtriert (siehe 3.1.7)

LB-Medium, pH 7,8

- 25 g LB-Medium Trockenmedium (siehe 3.1.7)
- 1000 ml Aqua dest.

Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)-Lösung

2,13 g Natriumhydrogenphosphat (siehe 3.1.7)
100 ml Aqua bidest.

Oberer Laufpuffer für Western Blot Applikationen

200 ml Laufpuffer (s. o.)
500 µl NuPAGE™ Antioxidant (siehe 3.1.7)

PBS (»Phosphate Buffered Saline«), pH 7,4

8,0 g Natriumchlorid (siehe 3.1.7)
0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (siehe 3.1.7)
2,9 g Natriumhydrogenphosphat (siehe 3.1.7)
0,2 g Kaliumchlorid (siehe 3.1.7)
1000 ml Aqua dest.
pH 7,4 mit Natronlauge (siehe 3.1.7)

PBS (»Phosphate Buffered Saline«) / Tween 20

500 ml 1x PBS (s. o.)
250 µl Tween 20 (siehe 3.1.7)

RNA-Lysispuffer

1 ml RLT Puffer aus dem RNeasy® Mini Kit (siehe 3.1.5.2)
10 µl 2-Mercaptoethanol (siehe 3.1.7)

Transferpuffer für Western Blot Applikationen

850 ml Aqua dest.
100 ml Methanol (siehe 3.1.7)
50 ml NuPAGE™ Transfer Buffer (siehe 3.1.7)
1 ml NuPAGE™ Antioxidant

Transfektionsreagenz für die Calciumphosphat-Transfektion (einfacher Ansatz)

2 µg Plasmid-DNA
Je nach Menge Plasmid-DNA 1:1 HBS (2X) und 1,25 molare Calciumchloridlösung
auf 500 µl auffüllen

Zelllysepuffer (orientiert an RIPA-Puffer)

50 mM Tris, pH 7,4 (siehe 3.1.7)

150 mM Natriumchlorid (siehe 3.1.7)

0,1% Nonidet P-40 Substitute (siehe 3.1.7)

10 % Glycerol (siehe 3.1.7)

25 mM Natrium- β -Glycerophosphat (siehe 3.1.7)

3.1.9 Geräte und sonstiges Zubehör

- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Artikelnummer: G2940CA
- Bio Photometer, Eppendorf AG, Hamburg, Artikelnummer: 613100202
- Brutschrank, Binder CB 150, Binder Tuttlingen, Artikelnummer: 02-32014
- Electronic Rührer Multipoint HP 6, Variomag, USA
- Elektrophoresekammer: Model No. HU6 / Serial No. 3277, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Lichtmikroskop Zeiss IM 35, Carl Zeiss, Göttingen
- Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg
- Mikrowelle, Moulinex, Mikro-Cef FM B 935 Moulinex, Leipzig
- My iQ Cyclor qPCR Gerät inkl. iCyclor Thermal Cyclor with 96 x 0.2 ml Reaction Module, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Artikelnummer: 170-8720
- MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Artikelnummer: 170-9740
- Neubauer Zählkammer, VWR International GmbH, Darmstadt, Artikelnummer: 631-1131
- pH-Meter Model Knick 761, Calimatic, Niederlande
- Präzisionswaage, Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Artikelnummer 430-33
- Schüttelinkubator: Environmental Shaker, ES 20, Fa. PeqLab
- Schwenker GFL 3016, GFL, Burgwedel
- Sterilwerkbank: captair^Rbio, Fa. Erlab
- Stickstoffbehälter GT 40, 2 EINOX, VWR International (478-3216), Darmstadt
- Thermocycler: Techne cyclone 25, Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH
- Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg
- UV-Illuminator: Alpha Innotech, Chemilmager 5500
- Voltgerät Power PAC 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Artikelnummer: 17619

- Vortex Mixer, neoLab, Heidelberg, Artikelnummer: 7-2020
- Wasserbad, Köttermann GmbH & Co KG, 31311 Uetze / Hänigsen
- Westernblot-Apparatur:
 - Gelelektrophoresekammer XCell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummern: EI0001, EI0020, EI0002
 - Proteintransferkammer XCell II™ Blot Module, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Artikelnummer: NP0002
- Zentrifugen
 - Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg
 - Minifuge T Heraeus, Heraeus, Berlin

3.2 METHODEN

3.2.1 Vermehrung von Plasmiden durch Expression in kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien

3.2.1.1 Plasmid-Expression in kompetenten Bakterien allgemein

Um die oben genannten Basisplasmide bzw. cDNA-Plasmid-Konstrukte (nachfolgend »Plasmide« genannt) in Transfektionsansätzen verwenden zu können, musste eine Vermehrung (Anreicherung) vorgenommen werden. Die Plasmide wurden durch Transformation in kompetente Bakterienzellen (siehe 3.1.4) verbracht und diese anschließend mittels Kultivierung vermehrt. Auf diese Weise erhielt man eine Vielzahl an Kopien der benötigten Plasmide, deren Vorhandensein durch Restriktionsverdau mit gelelektrophoretischer Auftrennung der spezifischen Fragmente und photometrischer Konzentrationsbestimmung nachgewiesen wurde.

3.2.1.2 Transformation

Bei der Transformation wurden die Plasmide in kompetente Bakterien (siehe 3.1.4) verbracht. Hierzu mussten Agarplatten (Bakterienkulturschalen) hergestellt werden, indem zunächst 200 ml LB-Agar (siehe 3.1.8) aufgekocht, im Wasserbad auf 50 °C temperiert und mit 1 ml steril filtrierter Ampicillin-Stammlösung (siehe 3.1.7) versetzt wurde. Unter sterilen Bedingungen wurden Kulturschalen (siehe 3.1.7) mit jeweils 15 ml des präparierten LB-Agars befüllt und nach Erstarren und vollständigem Auskühlen mit Parafilm (siehe 3.1.7) verschlossen.

Die fertigen Agarplatten wurden bei 4°C aufbewahrt; mindestens zwei wurden auf Raumtemperatur (RT) gehalten und nachfolgend weiterverwendet.

200 µl der kompetenten Bakterienzellen versetzte man mit 1 µl der entsprechenden Plasmid-Probe und lagerte diese 20 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz 30 Sekunden lang auf 42°C erwärmt und erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend gab man 250 µl auf RT vorgewärmtes SOC-Medium (siehe 3.1.5.2, Qiagen PCR cloning plus Kit) in den Transformationsansatz und vermischte beides durch vorsichtiges Pipettieren miteinander.

Danach trug man je 50-250 µl der transformierten Bakterien auf mindestens zwei Agarplatten auf und strich die Suspension gleichmäßig aus. Nach einer Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37°C wurden einzelne Bakterienkolonien selektiert und in 2 ml LB-Ampicillin-Medium (Herstellung siehe 3.2.1.3) überführt.

Diese Suspensionskultur plasmidtragender Bakterien war Ausgangssubstanz für die Amplifikation der Basisplasmide bzw. cDNA-Plasmid-Konstrukte im Maxi-Prep-Verfahren.

3.2.1.3 Plasmid-Amplifikation (Maxi-Prep-Verfahren)

Für eine Transfektion wurden Basisplasmide bzw. cDNA-Plasmid-Konstrukte (nachfolgend »Plasmide« genannt) in Mengenbereichen bis zu 3000 ng/µl benötigt. Hierfür eignete sich ein bakterielles Vermehrungsverfahren, das von einer Suspensionskultur plasmidtragender Bakterien ausgeht. Nach Vermehrung der Bakterien in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin (siehe 3.1.8) wurde mit Hilfe des NucleoBond® PC 500 - Kits (siehe 3.1.5.2) eine alkalische Lysis der Bakterien mit nachfolgender DNA-Aufreinigung durch Anionenaustauscherharze durchgeführt. Endprodukt war eine gereinigte, konzentrierte, wässrige Plasmidlösung.

Zunächst wurde steriles LB-Medium hergestellt, indem man 25 mg Trockenmedium (siehe 3.1.7) in 1000 ml Aqua dest. löste. Diese Lösung wurde aufgekocht, zwei Stunden bei 180°C autoklaviert und abschließend bei 4°C gelagert.

Nun wurde in mehreren Ansätzen jeweils eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte aus dem Transformationsversuch vorsichtig mit einer Pipettenspitze abgetragen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 2 ml LB-Medium (siehe 3.1.8) sowie 4 µl Ampicillin-Stammlösung überführt. Diese Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 250 Umdrehungen/min in einem Schüttelinkubator (siehe 3.1.9) gehalten.

250 ml LB-Medium sowie 500 µl Ampicillin-Stammlösung wurden in einen Erlenmeyerkolben vorgelegt und 5 µl Bakteriensuspension aus der Übernachtkultur zugegeben.

Dieser Ansatz wurde bei 37°C und 250 Umdrehungen/min über Nacht auf einem Schüttelinkubator bewegt. Anschließend wurden die 250 ml auf 5 Zentrifugenröhrchen (50 ml) verteilt. Diese wurden 15 Minuten bei 6000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Bakterienpellets am Boden der Röhrchen wurden in insgesamt 12 ml Resuspensionspuffer aufgenommen.

Anschließend wurde zu dieser Suspension 12 ml Lysispuffer gegeben, dieser vorsichtig eingemischt und anschließend 2-3 min bei RT inkubiert. 12 ml Neutralisationspuffer wurden zugegeben; die Suspension wurde erneut vorsichtig gemischt und anschließend 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Nachfolgend wurde das Bakterienlysat 40 min durch einen mit einigen Tropfen Equilibrierungspuffer befeuchteten Filter gefiltert und der plasmidhaltige Durchfluss aufgefangen, während man den Filter verwarf. Anschließend wurde eine Silica-Membran equilibriert, indem man 6 ml Equilibrierungspuffer auf die Säule pipettierte und den Durchfluss nach Abtropfen verwarf. Im Folgenden wurde das Filtrat auf die Säule gegeben. Im Durchfluss wurden die DNA-Moleküle in der Membran gebunden. Nachfolgend wurde die Membran in der Säule zweimal durch die Zugabe von je 32 ml Waschpuffer gereinigt. Hierbei wurden die verbliebenen Bestandteile der zuvor verwendeten Lösungen sowie bakterielle Kohlenhydrate entfernt. Durch die abschließende Zugabe von 15 ml Elutionspuffer wurde die DNA aus der Säule gelöst. Das Eluat wurde in entsprechend großen Zentrifugenröhrchen aufgefangen und anschließend durch die Zugabe von 11 ml Isopropanol präzipitiert. Hierzu wurde die Lösung 30 Minuten bei 15.000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Nachfolgend wurde das DNA-Pellet durch Zugabe von 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei 15.000xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen. Nach einer 10-minütigen Trocknungsphase (Inkubation bei 37°C) wurde das entstandene DNA-Pellet in 500 µl Aqua purificata gelöst. Durch die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA im Spektralphotometer (siehe 3.1.9) wurde der DNA-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt.

3.2.1.4 Spezifischer Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen dient der sequenzspezifischen Zerschneidung von DNA-Molekülen.

Die verwendeten Enzyme (siehe 3.1.5.1) wurden in einer Konzentration von 50 units/µl eingesetzt und besaßen eine optimale Schneidetemperatur von 37°C.

Bei der Verwendung von einem Restriktionsenzym wurde 1 µl eingesetzt, bei der Verwendung von zwei Restriktionsenzymen je 0,5 µl sowie 2,5 µl des dazugehörigen Puffers und 1 µg Plasmid-DNA aus dem Maxi-Prep-Verfahren in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert (siehe Tabelle 2) und mit Aqua purificata auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Tabelle 2 Übersicht der für die Plasmide im Restriktionsverdau verwendeten Endonukleasen mit Angabe der entstehenden Fragmentgrößen

Plasmid	Verwendetes Restriktionsenzym	Puffer	Fragmentgrößen (Anzahl bp)
pcDNA6/V5-His B	HincII	Tango®	234, 759, 1967, 2188
pCMVsL4V5blas	HinDIII EcoRI	Tango®	4677, 5114
pCMVZFP67neo	HincII	Tango®	2422, 4653
pGFPdhE1A1	EcoRI	Tango®	1443, 3933
pAD5U6shRNA1-LTBP4	HinDIII EcoRI	Tango®	398, 3284

Abbildungen der Vektorkarten mit Restriktionsschnittstellen befinden sich in Absatz 3.1.2.

3.2.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente

Zur Überprüfung der Spezifität der DNA-Fragmente wurden die enzymatisch verdauten Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufmedium wurde ein 1%iges TAE-Agarosegel verwendet, dem zum Zwecke der Fragmentdarstellung per Chemilumineszenz Ethidiumbromid zugefügt wurde. Als Größenmarker diente ein DNA-Standard (»DNA-Ladder«, Gemisch aus Oligonukleotiden bekannter Länge).

In einem Erlenmeyerkolben wurden in 100 ml TAE Puffer 1 g Agarose unter Aufkochung gelöst und 4 µl Ethidiumbromid eingerührt (siehe 3.1.7). Dieses wurde als etwa 0,5 cm starkes Gel in die Elektrophoresekammer (siehe 3.1.9) gegossen und nach Aushärtung mit TAE Puffer überschichtet. Anschließend wurden je 10 µl der DNA in wässriger Lösung (mit Probenpuffer vermennt) in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandard dienten 5µl DNA-Ladder (siehe 3.1.7). Die DNA-Fragmente in der Geltasche wurden 40 Minuten bei 110 V (Spannung) elektrophoretisch aufgetrennt.

Auf einem UV-Illuminator (siehe 3.1.9) wurde das Gel mit einer Wellenlänge von 405 nm belichtet und die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden der DNA-Fragmente zur Beurteilung der Größe mit denen der DNA-Ladder verglichen.

Mindestens zwei Proben der erfolgreich transformierten Suspensionskulturen plasmidtragender Bakterien wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -80 °C zur weiteren Verarbeitung konserviert.

3.2.2 Zellkultur und Transfektion der Zelllinie HEK293T

3.2.2.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagerten Zellen wurden im Wasserbad (siehe 3.1.9) bei 37°C aufgetaut. Vor dem Öffnen musste das Kryoröhrchen unter der Sterilwerkbank mit 70%igem Alkohol desinfiziert werden. Daraufhin wurde der Inhalt des Röhrchens in ein mit 8 ml Vollmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit einem Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin der Konzentration 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin, 1 % Glutamin 200 mM und 10% nicht hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (siehe 3.1.7)) gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert, um eine Trennung der Zellen von dem in dem Einfriermedium enthaltenen DMSO (Dimethylsulfoxid) durch Zentrifugation (1000xg, 5 Min., RT) zu erreichen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 12,5 ml Vollmedium (s. o.) aufgenommen. Durch vorsichtiges Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt und anschließend in eine 75 cm²- Zellkulturflasche (siehe 3.1.7) überführt. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (siehe 3.1.9) bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.2.2 Zellbeurteilung, Mediumwechsel und Passagieren

Der Gesundheitszustand der Zellen wurde täglich optisch durch das Lichtmikroskop anhand folgender Kriterien beurteilt: Dichte der Zellverbände, Zellform und -größe, Zytoplasmaausläufer, Mitosestadien, Kernveränderungen, Anzahl toter Zellen im Überstand und Wachstumsgeschwindigkeit. Zum Mediumwechsel wurde unter sterilen Bedingungen das verbrauchte Medium abgesaugt und 12,5 ml neues Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte im Allgemeinen jeden dritten Tag. Die Dichte des Zellrasens in einer Zellkulturflasche wurde lichtmikroskopisch beurteilt, die Zellen bis zur Konfluenz (Zusammenfluss, Zellrasendichte = 100%) angezüchtet und daraufhin subpassagiert. Die einzelnen Passagen lieferten das Untersuchungsmaterial für alle angewandten Methoden. Eine 75 cm² Zellkulturflasche mit konfluentem Zellrasen wurde 1:3 umgesetzt, das heißt die Zellen wurden gleichmäßig auf drei neue 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt. Nach Absaugen von Medium und Spülung mit DPBS (siehe 3.1.7) erfolgte die Zugabe von 2,5 ml 10% Trypsin-EDTA (siehe 3.1.7) auf den Zellrasen. Nach 3-5 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden 5 ml Medium auf die Zellen gegeben, die Zelllösung vorsichtig resuspendiert und nach Pipettieren in 50 ml Zentrifugenröhrchen 5 Minuten lang bei 1.200xg zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 2,5 ml Medium pro neue Zellkulturflasche resuspendiert, je 2,5 ml in die mit 10 ml Medium vorgelegten Zellkulturflaschen gegeben und in den Brutschrank verbracht.

3.2.2.3 Einfrieren der Zellen (Kryokonservierung)

Zur Kryokonservierung wurde eine 75 cm² Zellkulturflasche mit konfluentem Zellrasen zunächst wie bei dem Verfahren des Passagierens (s. o.) behandelt. Nach der Zentrifugation wurden jedoch anstatt Vollmedium 4 ml Einfriermedium (hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum mit DMSO, siehe 3.1.8) zur Resuspension verwendet. Schnellstmöglich wurde anschließend je 1 ml Zellsuspension in Kryoröhrchen (siehe 3.1.7) pipettiert und etappenweise eingefroren (24 Stunden bei -20°C, 24 Stunden bei -80°C, dauerhaft bei -196°C in flüssigem Stickstoff).

3.2.2.4 Passagieren für die Calciumphosphat-Transfektion

Eine Zellkulturflasche mit konfluentem Zellrasen wurde trypsiniert (siehe 3.2.2.2) und das Zellpellet nach Zentrifugation mit 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl im Medium mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (siehe 3.1.9) nach folgender Gleichung bestimmt (bei Auszählung von 5 Quadraten):

Gleichung 1
$$x = \frac{\text{Zellzahl}}{0,2} \times \mu\text{lMedium}$$

$x = \text{Zellzahl} / \mu\text{l}$

Für den Transfektionsansatz kamen sechs Zellkultur-Testplatten mit jeweils sechs Wells (Sechs-Well-Platten, siehe 3.1.7) zum Einsatz. In jedes Well wurde 2,5 ml Medium vorgelegt und 10⁷ Zellen hineinpipettiert. Diese Platten wurden anschließend vor der Calciumphosphat-Transfektion 24 Stunden bis zu einer Dichte des Zellrasens von mindestens 80% im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.2.5 Prinzip der Calciumphosphat-Transfektion

Diese Transfektionsmethode beruht auf dem Prinzip der Calciumphosphatpräzipitation. Die Plasmid-DNA wird mit Calcium und Phosphatpuffer vermengt, sodass sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA bildet. Pipettiert man dieses Präzipitat auf die Zellen, nehmen sie dieses per Endozytose auf. Ein Teil der Zellen transportiert die DNA bis zum Kern, wo sie transkribiert und anschließend translatiert wird (Mülhardt 1999).

3.2.2.6 Protokoll der Calciumphosphat-Transfektion

Vor der Anfertigung des Transfektionsreagenz müssen zunächst eine 0,25 M Calciumchlorid-Lösung sowie 2xHBS hergestellt werden (siehe 3.1.7).

Für die Calciumchlorid-Lösung werden 2,77 g CaCl_2 in 100 ml Aqua bidest. gelöst und steril filtriert. Für das 2xHBS werden 2 ml 150 mM Na_2HPO_4 -Lösung (Herstellung durch Mischung von 2,13 g Na_2HPO_4 mit 100 ml Aqua bidest) benötigt. Weiterhin fügt man 3273 mg NaCl und 2383 mg HEPES hinzu und füllt die Mischung bis 200 ml mit Aqua bidest. auf. Vor jedem Gebrauch muss das 2xHBS mit NaOH auf pH 7,1 eingestellt und steril filtriert werden (Chemikalien siehe 3.1.7).

Für einen einfachen Transfektionsansatz werden 2 μg DNA in ein steriles 4 ml Röhrchen (siehe 3.1.7) gegeben. In einem Verhältnis von 1:1 wird nun insgesamt so viel Calciumchlorid-Lösung und 2xHBS hinzugefügt, bis das Gesamtvolumen 500 μl beträgt. Hierzu wird zunächst die Calciumchlorid-Lösung zu der DNA in das Röhrchen pipettiert. Anschließend muss für die Präzipitatbildung das 2xHBS tröpfchenweise und vorsichtig das Gefäß schwenkend hinzugefügt werden.

Zu den für die Transfektion passagierten Zellen mit Medium (siehe 3.2.2.4) wird wieder tröpfchenweise unter vorsichtigem Schwenken das Transfektionsreagenz zugegeben.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 wird vorsichtig das Medium gewechselt und die Transfektionseffizienz per mikroskopischer Fluoreszenzanalyse (siehe 3.2.2.7) ermittelt. Erneut werden die transfizierten Zellen 24 Stunden nach o. g. Schema inkubiert und die Transfektionsrate dokumentiert. Anschließend, das heißt nach 72 Stunden Transfektion, werden sie für nachfolgende Untersuchungen geerntet.

3.2.2.7 Fluoreszenzanalyse und Mikroskopie

Neben der mikroskopischen Zellbeurteilung wurde während eines Transfektionsansatzes täglich die Transfektionseffizienz anhand der mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (siehe 3.1.9) dokumentiert. Hierzu wurde die fluoreszierende Eigenschaft des Proteins GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) genutzt.

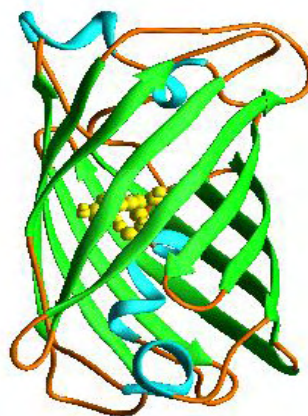


Abbildung 1 Überblick über die Struktur des GFP. Das Fluorophor befindet sich im geometrischen Zentrum der als beta-Barrel bezeichneten Faltungstopologie und ist ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon, das aus den Aminosäuren der Positionen 65-67 durch Faltung gebildet wird (Chen, Shen et al. 2005).

Dieses Protein zeigt bei der rekombinanten Expression in eukaryontischen wie auch bakteriellen Zellen intensive, direkt sichtbare Fluoreszenz und benötigt dazu keine exogenen Substrate oder Kofaktoren (siehe Abbildung 1). Dies demonstriert, dass sich das GFP als biologische Sonde zum Studium der Genexpression sowie der Proteinlokalisierung in lebenden Zellen verwenden lässt (Chalfie 1995).

3.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.3.1 Übersicht

Das Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestand in der Quantifizierung von Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) bestimmter Gene in epithelialen Zellen, um Informationen über die transkriptionelle Regulation (Genregulation) der betreffenden Gene in diesen Proben zu erhalten (Genexpressionsprofil). Um zu ermitteln, ob und in welcher relativen Menge die mRNA eines Gens in den Proben vorhanden ist, musste zunächst eine Isolierung der RNA aus den Proben erfolgen (siehe 3.2.3.2.1).

Anschließend war eine reverse Transkription der RNA (RT, siehe 3.2.3.3) in komplementäre DNA (cDNA, complementary DNA) erforderlich. Die cDNA wurde in der Folge durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) qualitativ oder quantitativ nachgewiesen (siehe 3.2.3.1).

Die Kombination aus reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion wird als qRT-PCR bezeichnet. Für die PCR sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer, siehe 3.2.3.4.2) notwendig, welche für das zu untersuchende Gen (gene of interest, GOI, Zielgen) spezifisch sind. Die Quantifizierung der mRNA des zu untersuchenden Gens durch qRT-PCR erfolgte unter Einbeziehung von Referenzgenen (siehe 3.2.3.4.4) mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung (siehe 3.2.3.4.10). Das Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war die Erkenntnis, wie viel mRNA eines bestimmten Gens in einer Probegruppe im Vergleich zu einer anderen Probegruppe enthalten ist.

3.2.3.2 RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle

3.2.3.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (RNeasy® Mini Kit, Qiagen GmbH) isoliert.

Die Zellen in den Wells der Testplatten aus dem Transfektionsansatz (siehe 3.2.2.6) wurden nach der Entfernung des Mediums mit DPBS gespült und mit RNA-Lysispuffer lysiert. Auf die Zellen wurden 350 μ l RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (siehe 3.1.8) pipettiert.

Um eine vollständige Zelllysis und Homogenisierung erreichen zu können, wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von dem Boden der Testplatte geschabt, jeweils in einen QiaShredder™ (siehe 3.1.7) auf Eis überführt und nachfolgend 2 Minuten lang bei 14.000 xg und 4 °C zentrifugiert.

Zu dem Durchfluss wurden jeweils 350 µl 70%-Ethanol (siehe 3.1.7) pipettiert, diese 700 µl auf eine Säule gegeben und 20 Sekunden bei 11.000xg und RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses erfolgte die Zugabe von jeweils 350 µl RW1-Puffer, Zentrifugation 20 Sekunden bei 11.000xg und RT sowie erneute Durchflussentfernung und anschließende Minimierung der DNA-Anteile in der Probe mit Hilfe des RNase-Free DNase Set (siehe 3.1.5.2). Dazu wurden 10 µl DNase-I-stock solution mit 70 µl RDD-Puffer (beides Bestandteile des Sets) gemischt, auf die Säule mit der Probe gegeben und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert (DNA-Verdau).

Es erfolgte die Zugabe von jeweils 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen, Zentrifugation 20 Sekunden bei 11.000xg und RT, Durchflussentfernung, Zugabe von 500 µl RPE-Puffer mit erneuter Zentrifugation 20 Sekunden bei 11.000xg und Durchflussentfernung. Es wurden erneut je 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen gegeben, 2 Minuten bei 11.000xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und anschließend die Säulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Aus der Säulenmembran wurde die RNA durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Nach einminütiger Zentrifugation bei 11.000xg wurde die Säule entfernt und das RNA-Eluat auf Eis gestellt. Als Endprodukt des Verfahrens stand gereinigte RNA in wässriger Lösung zur Verfügung.

3.2.3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach der RNA-Isolierung (siehe 3.2.3.2.1) wurde die Konzentration jeder Probe in einem Spektralphotometer (Biophotometer, Fa. Eppendorf) bestimmt. Durch Beurteilung des Verhältnisses der Extinktionen bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm wurde dabei eine grobe Klassifizierung der Probenreinheit vorgenommen. Dabei wurde eine maximale Extinktion bei 260 nm als Hinweis für eine reine RNA-Lösung bewertet, während maximale Extinktionen bei 230 nm (Salze) und 280 nm (Proteine) als Hinweise auf Verunreinigungen interpretiert wurden. Proben-RNA, die in der spektralphotometrischen Analyse maximale Extinktionen bei 230, 280 oder 320 nm aufwiesen, wurden aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Proben wurden nach der Analyse auf 100 ng/µl verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Da RNA labil gegen den Abbau durch RNAsen ist, wurde die RNA-Integrität durch miniaturisierte Kapillarelektrophorese (Lab-on-a-chip-Verfahren) mit einem kommerziell erhältlichen System (RNA 6000 Nano Kit, Fa. Agilent) nach Angaben des Herstellers in einem entsprechenden Gerät (Bioanalyser 2100, Fa. Agilent) untersucht. Bei diesem Verfahren wird die RNA der Probe elektrophoretisch aufgetrennt und fluorometrisch detektiert. Anhand des entstehenden Elektropherogramms wird durch die an das Gerät angeschlossene Software (Agilent Expert 2100, Fa. Agilent) ein Maß für die RNA-Integrität (RNA integrity number, RIN) berechnet. Die RIN kann zwischen 0 und 10 liegen, wobei die RNA-Integrität umso größer ist, je höher die RIN ist. Eine RIN von 0 ist gleichbedeutend mit kompletter RNA-Degradation; bei einer RIN von 10 unterliegt die RNA keiner Degradation. Basierend auf Empfehlungen der Literatur wurden Proben mit einer $RIN \leq 5$ aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (Schroeder, Mueller et al. 2006).

3.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Vor der quantitativen PCR (quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion; siehe 3.2.3.4) musste die isolierte Proben-RNA (siehe 3.2.3.2.1) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Reverse Transkription, RT, cDNA-Synthese). Für diesen Arbeitsschritt wurde ein kommerziell erhältliches System (iScript™cDNA Synthesis Kit, siehe 3.1.5.2) verwendet, welches Random-Hexamer-Nukleotide und Oligo-dT-Nukleotide als Startpunkte für die Reverse Transkription beinhaltet. So wurden rRNA, tRNA und mRNA revers transkribiert. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Probe 100 ng Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese verwendet. In einem zyklisch programmierbaren Thermoblock (Thermocycler, siehe 3.1.9) wurde die Reverse Transkription (nach 5 Minuten Inkubation bei 25 °C) durch 30-minütige Inkubation bei 42 °C vorgenommen. Nach der reversen Transkription wurde die RNA-abhängige DNA-Polymerase durch 5-minütige Inkubation bei 85 °C inaktiviert. Anschließend wurde die cDNA mit 180 µl Wasser von 20 µl auf 200 µl verdünnt und bei -20°C gelagert. Endprodukt des Verfahrens waren für jede Probe 200 µl cDNA, deren qualitative (enthaltene Sequenzen) und quantitative (Kopienzahl der enthaltenen Sequenzen) Zusammensetzung die entsprechende Zusammensetzung der eingesetzten RNA-Probe widerspiegelt.

3.2.3.4 Quantitative PCR

3.2.3.4.1 Überblick

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen (siehe 3.2.3.1) wird die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Sequenz (GOI, Gene Of Interest, Zielgen) relativ quantifiziert.

Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch reverse Transkription (siehe 3.2.3.3) und anschließende quantitative PCR (qRT-PCR).

Die quantitative oder „real-time“ PCR (qPCR) repräsentiert eine spezifische und sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Bustin 2000; Bustin 2002). Im Gegensatz zur Endprodukt-PCR (konventionelle PCR, kPCR), bei der PCR-Produkte erst nach Beendigung aller Amplifikationszyklen durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden, ermöglicht es die qPCR, bei der nach jedem Amplifikationszyklus (siehe 3.2.3.4.7) der Gehalt an doppelsträngiger DNA (dsDNA) gemessen wird, Aussagen über die Kopienzahl einer bestimmten DNA-Sequenz in der Probe zu treffen (Higuchi, Fockler et al. 1993).

Bei der qPCR wird ein Thermocycler (My iQ Cycler qPCR Gerät, siehe 3.1.9) eingesetzt, der eine Vorrichtung zur Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffs enthält (Bustin 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde das Fluorophor SybrGreen genutzt (Bustin 2000).

Dieser Cyanin-Farbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige (ds) DNA und fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht. Durch Messung der Fluoreszenzintensität nach jedem PCR-Zyklus konnte jeweils die Menge an PCR-Produkten bestimmt werden. Nach Beendigung des gesamten qPCR-Experiments ergibt die Aneinanderreihung der einzelnen photometrischen Fluoreszenzwerte durch die angeschlossene Geräte-Software (iCycler iQ Optical System Software (Version 3.1), Fa. BioRad) eine Amplifikationskurve, die typischerweise einen sigmoiden Verlauf zeigt. Während der ersten Amplifikationszyklen sind der Gehalt an PCR-Produkten und damit die resultierende Fluoreszenz noch unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb die Amplifikationskurve in diesem Abschnitt eine Steigung von null besitzt (Basislinie, baseline). Nach Eintritt in den detektierbaren Bereich wird (bei einer maximalen PCR-Effizienz; siehe 3.2.3.4.3) in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt registriert, was sich als exponentieller Anstieg der Amplifikationskurve darstellt. Durch Substratverbrauch sinkt die Vermehrungsrate im späteren Verlauf der Reaktion bis auf null ab, was zu einer Abflachung der Amplifikationskurve führt.

Zur Quantifizierung muss der Verlauf der Amplifikationskurve auf einen Zahlenwert (cycle threshold value; C_T -Wert) reduziert werden. Der C_T -Wert entspricht der Zykluszahl, bei der die Amplifikationskurve beim Übergang in den exponentiellen Anstieg einen Fluoreszenzschwellenwert (cycle threshold) überschreitet, der in der vorliegenden Arbeit auf einen Wert von 100 RFU (relative fluorescence units) festgelegt wurde.

Die C_T -Werte einer cDNA-Sequenz in verschiedenen Proben stellen die Basis für die Berechnung der relativen Expression der korrespondierenden mRNA-Sequenz in den entsprechenden Proben dar (Livak and Schmittgen 2001).

Da das Fluorophor SybrGreen unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, ist keine Unterscheidung zwischen Fluoreszenzsignalen, die vom spezifischen PCR-Produkt verursacht werden und anderen doppelsträngigen DNA-Molekülen möglich (Bustin 2000). Während es sich bei diesen Kontaminationen um verschiedene Sorten von dsDNA handeln kann, stellen Amplifikationsprodukte aneinander gelagerter Primer (Primerdimere, siehe 3.2.3.4.9) die häufigste Form dar. Zur Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren wurde die Probe daher im Anschluss an die qPCR einer allmählichen Temperaturerhöhung ausgesetzt, wobei die Fluoreszenz ständig kontrolliert wurde (Schmelzkurvenanalyse; siehe 3.2.3.4.9). Im Verlauf einer solchen Schmelzkurvenanalyse wird für jede Spezies an dsDNA (PCR-Produkt, Primerdimer) ein produktspezifischer Schmelzpunkt erreicht, bei dem die Moleküle der entsprechenden Spezies in einzelsträngige DNA (single stranded DNA, ssDNA) denaturieren. Da bei dieser Temperatur der eingelagerte Farbstoff (SybrGreen) freigegeben wird und folglich nicht weiter fluoresziert, kommt es zu einem steilen Fluoreszenzabfall, dessen Temperatur für die entsprechende dsDNA-Sequenz charakteristisch ist. In der vorliegenden Arbeit wurden für jede Probe drei qPCR-Experimente pro GOI (gene of interest, siehe oben) durchgeführt und in Kombination ausgewertet (Triplet-Ansatz).

3.2.3.4.2 qPCR Primer

Für das Anlagern der Taq-Polymerase (siehe 3.2.3.4.7) im Verlauf der qPCR werden je zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (sense und antisense Primer) benötigt (siehe 3.2.3.4.7), die mit der Komplementärsequenz der cDNA hybridisieren und so das PCR-Produkt von beiden Seiten begrenzen (Lehninger 2001). Die Sequenzen der verwendeten Primer (Primersequenz) legen durch ihr sequenzspezifisches Hybridisierungsverhalten fest, welche cDNA-Sequenz im Verlauf eines qPCR-Experiments amplifiziert wird. Daher ist die Bestimmung geeigneter Primersequenzen die zentrale Voraussetzung für die Etablierung einer qPCR-Untersuchungsmethode (qPCR Assay).

Zur Etablierung eines neuen qPCR Assays wurde zunächst die Sequenz des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) im Internet (NIH Genebank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) recherchiert. Die ermittelten Sequenzen wurden gegebenenfalls softwaregestützt in einem Sequenzvergleich (alignment) untersucht (GeneDoc, Version 2.6.002) um Sequenzvariabilitäten und / oder Transkriptvarianten (splicing variants, u. a.) zu beurteilen und als Resultat zu bestimmen, welche Sequenz in der qPCR-Untersuchungsmethode nachgewiesen werden soll (Targetgen, siehe 3.2.3.4.10).

In der Sequenz des Targetgens wurde anschließend der kodierende Sequenzbereich (kodierende Sequenz, coding sequence, cds) softwaregestützt ermittelt (Biowire Jellyfish, Version 1.5).

Dabei wurde für die vorliegende Arbeit definiert, dass der Adeninrest des Startcodons der kodierenden Sequenz als Nukleotid 1 bezeichnet wird und alle folgenden Nukleotide entsprechend nummeriert werden, wobei zwischengeschaltete, nicht kodierende Sequenzbereiche (Introns) nicht in der Zählung berücksichtigt wurden. Innerhalb der kodierenden Sequenz (cds, siehe oben) wurden in der Folge durch Sequenzvergleich mit öffentlich verfügbaren, annotierten Sequenzdatenbanken (European Bioinformatics Institute (EBI) Ensembl, www.ensembl.org) die Grenzen zwischen benachbarten kodierenden Sequenzbereichen (Exon-Exon-Grenzen) ermittelt (Lehninger 2001). Abschließend wurden softwaregestützt (Primer3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) zwei ineinander verschachtelte Primerpaare (nested primer set) ermittelt, die alle um eine Exon-Exon-Grenze gruppiert sind (Rozen and Skaletsky 2000).

Die Integration von Exon-Exon-Grenzen sorgt neben der Behandlung der RNA durch DNase (siehe 3.2.3.2.1) für eine ausschließliche Detektion von cDNA (siehe 3.2.3.3), während genomische DNA (gDNA) nicht nachgewiesen wird. Bei der Ermittlung der Primersequenzen wurden die Standardparameter (default parameters) der Software (Primer3, siehe oben) verwendet (Idealwerte: PCR-Produktlänge = 175; Primerlänge = 20 Nukleotide; Schmelzpunkt (T_m) = 60 °C; GC-Gehalt = 50 %; Selbstkomplementarität = 0; 3'-Komplementarität = 0). Nach der Ermittlung der Sequenz wurden die entsprechenden Nukleotide kommerziell synthetisch hergestellt (Fa. MWG Biotech) und zum Abschluss der Etablierung des entsprechenden qPCR Assay in Qualitätskontrollexperimenten (siehe 3.2.3.4.3) untersucht.

3.2.3.4.3 qPCR Assay Etablierung

Für die Etablierung einer qPCR-Untersuchungsmethode (qPCR Assay) wurden deren Sensitivität, Spezifität und Effizienz festgestellt. Weiterhin wurden die optimale Temperatur für Annealing und Elongation (siehe 3.2.3.4.7) sowie der Schmelzpunkt des qPCR-Produkts festgestellt. Die Sensitivität bezeichnet die geringste Kopienzahl an Targetgen-Sequenz (3.2.3.4.10), die in einem qPCR-Experiment feststellbar ist. Die Spezifität beschreibt die Neigung der eingesetzten qPCR-Primer (siehe 3.2.3.4.3) zur ausschließlichen Bindung an die Targetsequenz, während die qPCR-Effizienz ein Maß für die Vervielfachungsrate des qPCR-Produkts in einem Zyklus (siehe 3.2.3.4.7) der qPCR beschreibt. Die optimale Temperatur für Annealing und Elongation ist die Inkubationstemperatur während der Phase von Hybridisierung und Neustrangsynthese, bei welcher ein maximaler Unterschied zwischen spezifischer und Negativkontrollamplifikation besteht.

Der Schmelzpunkt des qPCR-Produkts beschreibt die Temperatur des stärksten Fluoreszenzsignalverlustes in der Schmelzkurvenanalyse (siehe 3.2.3.4.9).

Zur Bestimmung der qPCR-Sensitivität wurde eine 7-stufige \log_{10} -Verdünnungsreihe des entsprechenden qPCR-Produkts (500 pg bis 0,5 fg) als Proben-DNA (template DNA) in qPCR-Experimenten mit den entsprechenden Primern untersucht. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die qPCR-Amplifikationskurve der Assay Etablierung für TGF- β 1.

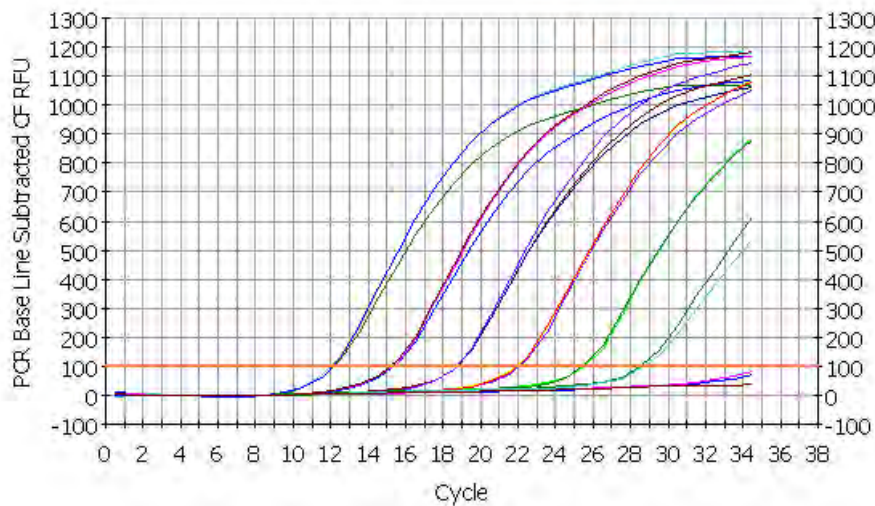


Abbildung 2 **qPCR-Amplifikationskurve für TGF- β 1**
x-Achse: qPCR-Zyklus
y-Achse: SybrGreen® Fluoreszenzintensität

Die niedrigste Verdünnungsstufe, bei deren Verwendung eine qPCR-Amplifikation zu beobachten war, stellt die Grenze der Sensitivität des entsprechenden qPCR Assays dar. Das Ergebnis kann als Masse (fg, femtogramm) oder als Kopienzahl ausgedrückt werden. Die Spezifität des qPCR Assays wurde in qPCR-Experimenten mit cDNA (siehe 3.2.3.3) untersucht. Nach den Experimenten wurde (a) die Schmelzkurve analysiert (siehe 3.2.3.4.9) und (b) das qPCR-Produkt durch Sequenzanalyse untersucht.

Zur Bestimmung der Sequenz von PCR-Produkten wurden diese in aufgereinigter Form an ein Sequenzierungslabor (Fa. SeqLab) versandt und dort sequenziert. Die Aufreinigung aus unreiner, wässriger Lösung (diese enthält noch Primer und Reaktionslösungen aus der vorangegangenen qPCR) wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (Qiaquick PCR product purification kit, siehe 3.1.5.2) eingesetzt. Dieses Verfahren basiert auf der Wirkung von Affinitätsäulen und setzt unreine, wässrige DNA-Lösungen in gereinigte, wässrige DNA-Lösungen um. In vielen Fällen ist in der Literatur keine Angabe zu finden, ob ein bestimmtes Gen in einem definierten Gewebe einer bestimmten Spezies transkribiert wird. Unter dieser Voraussetzung ist die oben beschriebene Spezifitätsuntersuchung in einer cDNA-Probe aus dem entsprechenden Gewebe gleichzeitig der qualitative Nachweis der Transkription des untersuchten Gens im untersuchten Gewebe.

Eine spezifische qPCR-Untersuchungsmethode wurde festgestellt, wenn (a) nur eine Amplitude in der Schmelzkurvenanalyse vorlag und wenn (b) die ermittelte Sequenz mit der erwarteten Sequenz des qPCR-Produkts zu > 90% übereinstimmte.

Zur Bestimmung der qPCR-Effizienz wurde eine 6-stufige \log_{10} -Verdünnungsreihe aus RNA (1 μg bis 10 pg) revers in cDNA transkribiert (siehe 3.2.3.3) und anschließend für jede qPCR-Untersuchungsmethode (qPCR Assay) mit den entsprechenden Primern untersucht. Die Bestimmung der qPCR-Effizienz erfolgte softwaregestützt durch eine Regressionsanalyse (siehe 3.2.3.4.1).

Ergebnis der Untersuchungen war die qPCR-Effizienz, die in Prozent (100 % entsprechen einer Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt während der exponentiellen Zyklen der qPCR (siehe 3.2.3.4.1)) oder als Steigung der Regressionsgeraden (slope) ausgedrückt werden kann (siehe Gleichung 2). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchungen qPCR Assays mit einer Effizienz von > 90 % verwendet.

Gleichung 2 $Effizienz = 10^{\left(-\frac{1}{Slope}\right)}$

Die optimale Temperatur für Annealing und Elongation (siehe 3.2.3.4.7) wurde durch ein qPCR-Experiment bestimmt, in welchem cDNA (siehe 3.2.3.3) als Probe eingesetzt wurde. Das qPCR-Protokoll (siehe 3.2.3.4.7) wurde für diese Untersuchungen in der Form abgewandelt, dass die Annealing / Elongation in Parallelansätzen bei unterschiedlichen Temperaturen (Gradienten-PCR; Temperaturgradient von 54 °C bis 64 °C) durchgeführt wurde. Ein Optimum liegt für die Temperatur vor, bei deren Verwendung ein größtmöglicher Unterschied zwischen spezifischer Amplifikation und Negativkontrollamplifikation besteht. Für die vorliegende Arbeit wurden qPCR-Untersuchungsmethoden eingesetzt, deren Temperaturoptimum bei 58 °C lag.

Der Schmelzpunkt des spezifischen qPCR-Produkts wurde durch qPCR-Experimente bestimmt, in welchen sequenzierte PCR-Produkte der entsprechenden Sequenz als Proben-DNA eingesetzt wurden (siehe 3.2.3.4.3).

In der Auswertung der Schmelzkurvenanalyse wurde die Temperatur festgestellt, bei welcher das entsprechende qPCR-Produkt in Einzelstränge zerfällt.

Ergebnis der Etablierungsarbeiten war jeweils eine qPCR-Untersuchungsmethode mit bekannter und qualitätskontrollierter Sensitivität, Spezifität, Effizienz, Optimaltemperatur des Annealing- / Elongationsschritts sowie einem bekannten Schmelzpunkt des qPCR-Produkts.

3.2.3.4.4 Referenzgene (housekeeping genes)

Zur Normalisierung der Daten aus qPCR-Experimenten wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsraten von Referenzgenen (siehe unten) in den entsprechenden Proben in die Auswertung einbezogen (siehe 3.2.3.4.10). Als Referenzgene werden Gene verwendet, die in vielen Geweben transkribiert werden und deren Expression nur wenig von äußeren Bedingungen abhängt (Radonic, Thulke et al. 2004). Sie werden im Gegensatz zu gewebsspezifischen, stark regulierten Genen (sog. Luxusgene) als »Haushaltsgene« (housekeeping genes) bezeichnet. Da sich in zahlreichen Untersuchungen gezeigt hat, dass kein Gen als universell einsetzbares Referenzgen geeignet ist, wurde in der vorliegenden Arbeit im Einklang mit entsprechenden Vorgaben aus der Literatur eine Kombination aus drei, in Voruntersuchungen experimentell ausgewählten Referenzgenen (siehe unten) verwendet (Vandesompele, De Preter et al. 2002).

3.2.3.4.5 Bestimmung geeigneter Referenzgene

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsraten von Referenzgenen zur Normalisierung der Daten aus qPCR-Experimenten eingesetzt (siehe 3.2.3.4.4). Da aus der Literatur bekannt ist, dass sich kein einzelnes Referenzgen als universell einsetzbarer Normalisierungsfaktor eignet, wurde mit Hilfe eines Algorithmus (GeNorm) in Voruntersuchungen geklärt, welche Kombination aus drei Referenzgenen für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit geeignet ist (Vandesompele, De Preter et al. 2002). Zu diesem Zweck wurde in Vorversuchen die Expressionsrate von 11 Referenzgenen (18s rRNA, 28s rRNA, GAPDH, β -Aktin, Ubiquitin, β -2-Mikroglobulin, YWHAZ, TATA-Box bindendes Protein, HPRT, ATP-Synthase Untereinheit 5B und Cyclophyllin) in einer Serie von 30 cDNA-Proben (siehe 3.2.3.3) untersucht. Die Proben wurden so gewählt, dass ihre vermutete transkriptionelle Variabilität dem Spektrum der Gesamtvariabilität des in den Experimenten zur vorliegenden Arbeit eingesetzten Probenpools entspricht. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden mit Hilfe des softwaregestützten Algorithmus GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) ausgewertet, um eine bestmögliche Kombination aus Referenzgenen festzustellen (Vandesompele, De Preter et al. 2002).

Bei der Auswertung im GeNorm-Algorithmus wird als erstes die relative Expression jedes Referenzgens in jeder Probe durch relative Quantifizierung (3.2.3.4.10) im Vergleich zur Probe mit dem niedrigsten C_T -Wert (3.2.3.4.8) für das entsprechende Referenzgen errechnet (comparative C_T method). Die so ermittelten relativen Expressionsraten werden in allen möglichen Kombinationen ins Verhältnis gestellt und die Quotienten jeweils zur Basis 2 logarithmiert (siehe Gleichung 3).

Aus der Zahlengruppe (Matrix) der logarithmierten Quotienten wird in der Folge für jede Kombination aus zwei Referenzgenen die Standardabweichung errechnet (siehe Gleichung 4), und anschließend wird aus allen Standardabweichungen, die mit Beteiligung eines Referenzgens berechnet wurden, der Mittelwert gebildet (siehe Gleichung 5). Dieser stellt ein Maß für die Expressionsstabilität des betreffenden Referenzgens im Kontext mit den übrigen Referenzgenen dar. Am Ende des Verfahrens werden die Mittelwerte der Standardabweichungen miteinander verglichen und das Referenzgen mit der geringsten Expressionsstabilität (maximaler Mittelwert, siehe oben) wird aus der Gruppe der Referenzgene ausgeschlossen. Anschließend wird der oben beschriebene Berechnungsweg für die verbleibenden Referenzgene erneut vorgenommen und wiederum das Referenzgen mit der geringsten Expressionsstabilität ausgeschlossen. Dieser Prozess wird wiederholt, bis drei in Kombination maximal stabile Referenzgene ermittelt worden sind (Vandesompele, De Preter et al. 2002).

Gleichung 3
$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \frac{a_{1j}}{a_{1k}}, \log_2 \frac{a_{2j}}{a_{2k}}, \dots, \log_2 \frac{a_{nj}}{a_{nk}} \right\}$$

Gleichung 4
$$V_{jk} = st.dev (A_{jk})$$

Gleichung 5
$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1}$$

Endprodukt des Verfahrens war die Festlegung einer Kombination aus drei Referenzgenen, die im experimentellen Kontext der vorliegenden Arbeit besonders stabil transkribiert werden. Diese Kombination wurde während der relativen Quantifizierung (siehe 3.2.3.4.10) zur Normalisierung der Expressionsrate aller zu untersuchenden Gene in allen Proben eingesetzt (siehe 3.2.3.4.8 und 3.2.3.4.4).

3.2.3.4.6 qPCR Kontrollen

Bei der Präparation von RNA (siehe 3.2.3.2.1) besteht die Möglichkeit einer Verunreinigung durch genomische DNA (Bustin 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit in jeder RNA-Probe untersucht, ob genomische DNA (gDNA) des β -Aktin-Gens zu finden ist.

Zu diesem Zweck wurden 2,5 ng RNA jeder Probe ohne vorherige reverse Transkription (siehe 3.2.3.3) in qPCR-Experimenten zur Detektion der Gensequenz von β -Aktin eingesetzt (No RT-Control, NRC).

Das Ergebnis dieser Untersuchung (C_T -Wert der qPCR zur Detektion von β -Aktin in 2,5 ng RNA) wurde durch relative Quantifizierung (siehe 3.2.3.4.10) mit dem Ergebnis

einer entsprechenden Untersuchung in der korrespondierenden cDNA (C_T -Wert der qPCR zur Detektion von β -Aktin in cDNA aus 2,5 ng RNA) verglichen. Lag die relative Menge an β -Aktin-Sequenzen in der RNA-Probe bei $< 4\%$ der Menge an β -Aktin-Sequenzen in der entsprechenden cDNA-Probe, wurde eine ausreichende Reinheit der RNA-Probe in Bezug auf genomische DNA festgestellt.

Zur Prüfung der qPCR-Spezifität wurde in jedem qPCR-Experiment eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher keine Probe (5 μ l Wasser statt 5 μ l cDNA, siehe 3.2.3.3) eingesetzt wurde (no template control, NTC). Experimente, in welchen in der Negativkontrolle eine Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts zu beobachten war (siehe 3.2.3.4.9), wurden wiederholt.

In jedem qPCR-Experiment wurde eine cDNA-Probe eingesetzt, für die durch vorangegangene Untersuchungen bekannt war, dass das zu untersuchende Gen (gene of interest, GOI) durch qPCR nachweisbar ist (Positivkontrolle). Experimente, in denen der Nachweis des GOI in der Positivkontrolle nicht gelang, wurden wiederholt.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten qPCR-Untersuchungsmethoden (qPCR-Assay) wurden in Vorversuchen bezüglich ihrer Sensitivität, Spezifität und Effizienz untersucht und bewertet (siehe 3.2.3.4.3). Für den Einsatz in den qPCR-Experimenten wurden nur qPCR-Assays verwendet, die in den Vorversuchen als tauglich bewertet wurden.

3.2.3.4.7 Protokoll der qPCR

Zur Bestimmung der PCR-Amplifikationskurve einer definierten cDNA-Sequenz in einer Probe wurde eine kommerziell erhältliche qPCR-Reaktionslösung (iQ SybrGreen Supermix, siehe 3.1.5.2) eingesetzt. Diese umfasst ein Reaktionsgemisch, welches die DNA-abhängige DNA-Polymerase (Hot Start Taq-Polymerase), Desoxyribonukleotide (dNTPs), SybrGreen, $MgCl_2$ (3 mM Endkonzentration) und einen Reaktionspuffer enthält. Für eine Reaktion wurden 5 μ l cDNA (hergestellt mit 2,5 ng RNA-Probe, siehe 3.2.3.3), 0,5 μ l (10 pmol) jedes der beiden entsprechenden qPCR-Primer (sense und antisense, siehe 3.2.3.4.3), 12,5 μ l qPCR Reaktionslösung (iQ SybrGreen Supermix) und 6,5 μ l Wasser in ein Reaktionsgefäß zusammengeführt und im Thermocycler (My iQ Cycler, siehe 3.1.9) inkubiert. Für die qPCR wurde ein einheitliches Temperaturprofil verwendet, welches nach Aktivierung der Polymerase durch dreiminütige Inkubation bei 95°C aus 35 Amplifikationszyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 95°C (Denaturierung, Denaturation) und 2 Minuten bei 58°C (Hybridisierung / Neustrangsynthese, Annealing / Elongation) bestand (Zweistufen-Protokoll, two step protocol). Im Verlauf dieser Zyklen wurde die Fluoreszenz der Proben während der Hybridisierung / Neustrangsynthese dauerhaft gemessen (Echtzeit-Datenanalyse, real time data analysis).

Für die anschließende Schmelzkurvenanalyse (siehe 3.2.3.4.9) wurden die Proben in 80 Stufen von 55°C auf 95°C erhitzt. Auf jeder Stufe wurde die Temperatur über 10 Sekunden konstant gehalten und dabei jeweils die Fluoreszenz der Proben gemessen.

Die gemessene Fluoreszenz jeder Probe wurde während der qPCR bezogen auf die Zyklen und während der Schmelzkurvenanalyse bezogen auf die Temperatur aufgezeichnet. Am Ende des Verfahrens standen für jede Probe die Daten aus drei Amplifikationskurven und drei Schmelzkurvenanalysen zur Verfügung.

3.2.3.4.8 Bestimmung der C_T-Werte (cycle threshold values)

Zur Bestimmung der relativen Menge der untersuchten cDNA-Spezies in den verschiedenen Proben wurden die in der qPCR gesammelten Amplifikations- und Schmelzkurven Daten (siehe 3.2.3.4.7) analysiert. Nach Festlegung des C_T-Wertes jeder Amplifikationskurve durch die Geräte-Software, welche die Amplifikationskurve quantitativ charakterisiert und die Basis für die weiteren Berechnungen darstellt (siehe 3.2.3.4.1), wurden die drei C_T-Werte (Triplet, siehe 3.2.3.4.1) jedes zu untersuchenden Gens (GOI, gene of interest) jeder Probe zum arithmetischen Mittelwert verrechnet. Dabei wurde geprüft, ob zwischen den einzelnen C_T-Werten eines Triplets Abweichungen bestehen. Triplets, deren C_T-Einzelwerte um > 0,5 streuten, wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen und die entsprechenden qPCR-Experimente wiederholt. Für die Bestimmung des kombinierten C_T-Wertes der drei Referenzgene (siehe 3.2.3.4.4) wurde das geometrische Mittel der einzelnen C_T-Werte berechnet (normalization factor) und für die weiteren Berechnungen (siehe 3.2.3.4.10) verwendet (Vandesompele, De Preter et al. 2002).

3.2.3.4.9 Auswertung der Schmelzkurvenanalyse

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse jeder qPCR (siehe 3.2.3.4.1) wurden mit den Ergebnissen der Etablierung der entsprechenden qPCR-Untersuchung (siehe 3.2.3.4.3) verglichen. Dabei wurde geprüft, ob der Schmelzpunkt des Produkts eines qPCR-Experiments mit dem Schmelzpunkt aus den entsprechenden Etablierungsversuchen übereinstimmt. Bei Abweichungen im Schmelzpunkt von mehr als $\pm 0,5^\circ\text{C}$ wurden die Ergebnisse aus den folgenden Auswertungen ausgeschlossen und die entsprechenden Experimente wiederholt.

3.2.3.4.10 Bestimmung der relativen Expression

Die gemittelten C_T -Werte (siehe 3.2.3.4.1) einer Probe wurden zur Bestimmung der relativen Expressionsrate des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) mit Hilfe der $\delta\delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak and Schmittgen 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Proben als *Testprobe* (*Test* = experimentell beeinflusste Probe, bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll) und als *Basisprobe* (*Ctrl* = experimentell unbeeinflusste Probe, die als Bezug für die Testprobe dient (siehe unten)) bezeichnet. Die untersuchten Gene wurden als *Targetgen* (*Targ* = zu untersuchendes Gen (gene of interest, GOI); siehe 3.2.3.4.1) und *Referenzgene* (*Ref* = Referenzgene, mit deren Hilfe die Expressionsrate des Targetgens normalisiert wird (siehe 3.2.3.4.4)) bezeichnet.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsrate eines Targetgens (siehe oben) in einer Testprobe (siehe oben) im Vergleich zur Expressionsrate des gleichen Targetgens in der korrespondierenden Basisprobe (siehe oben) anhand von Ergebnissen aus qPCR-Experimenten (C_T -Werte, siehe 3.2.3.4.8) berechnet. Dabei werden die Expressionsraten des Targetgens in beiden Proben im Vergleich zu den Expressionsraten von Referenzgenen (siehe oben) in den jeweils gleichen Proben normalisiert. Die Berechnung der normalisierten, relativen Expression eines Targetgens in einer Testprobe im Vergleich zur korrespondierenden Basisprobe erfolgt mit Hilfe der in Gleichung 6 dargestellten Formel.

Gleichung 6
$$FC_{GOI} = 2^{-((Re\ fCtrl - T\ arg\ Ctrl) - (Re\ fTest - T\ arg\ Test))}$$

FC_{GOI}	=	Fold Change (siehe unten) des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI)
$RefCtrl$	=	Geometrisches Mittel der C_T -Werte der Referenzgene in der Basisprobe
$RefTest$	=	Geometrisches Mittel der C_T -Werte der Referenzgene in der Testprobe
$TargCtrl$	=	C_T -Wert des Targetgens in der Basisprobe
$TargTest$	=	C_T -Wert des Targetgens in der Testprobe.

Das Ergebnis wird als Fold Change (*FC*) ausgedrückt und beschreibt die normalisierte Expressionsrate des GOI in der Testprobe (*Test*) als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des GOI in der korrespondierenden Basisprobe (*Ctrl*).

So ist etwa ein Ergebnis $FC_{LTBP-4} = 2$ gleichbedeutend mit der Aussage, dass in der Testprobe doppelt so viele Kopien an LTBP-4-mRNA wie in der Basisprobe vorliegen, und ein Ergebnis $FC_{LTBP-4} = 0,5$ ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass in der Testprobe halb so viele Kopien an LTBP-4-mRNA wie in der korrespondierenden Basisprobe zu finden sind.

3.2.3.4.11 Gruppenauswertung

Da in der vorliegenden Arbeit mit experimentellen Gruppen gearbeitet wurde (siehe 4.3.2.5.3), war keine logische Zuordnung einer bestimmten Testprobe zu einer bestimmten Basisprobe möglich (siehe 3.2.3.4.10). Daher erfolgte die Auswertung der Ergebnisse aus qPCR-Experimenten als Gruppenauswertung. Dabei wurden die qPCR-Ergebnisse der Basisprobengruppe zunächst zum so genannten δC_T -Wert ($\delta C_T = TargCtrl - RefCtrl$; siehe 3.2.3.4.10) verrechnet, der die normalisierte Expressionsrate des Targetgens (siehe 3.2.3.4.10) in den einzelnen Basisproben darstellt. Die so errechneten δC_T -Werte wurden in der Folge zum Median verrechnet, der die normalisierte Expressionsrate des Targetgens in der gesamten Basisprobengruppe charakterisiert.

Die qPCR-Ergebnisse der Testprobengruppe wurden analog zu den Daten der Basisprobengruppe zu δC_T -Werten ($\delta C_T = TargTest - RefTest$) für jede Testprobe verrechnet. Die so kalkulierten δC_T -Werte der einzelnen Testproben wurden im abschließenden Schritt der Auswertung entsprechend der Formel zur relativen Quantifizierung (siehe Gleichung 6) mit dem Median der δC_T -Werte der Basisprobengruppe (siehe oben) zum FC_{GOI} (siehe 3.2.3.4.10) verrechnet (Livak and Schmittgen 2001).

3.2.3.4.12 Darstellung der Ergebnisse

Für eine umfassende Beurteilung der Ergebnisse von qPCR-Experimenten sind neben den relativen Expressionsraten der Zielgene (GOI) in den Testproben auch deren Expressionsraten in den Basisproben (Kontrollproben) sowie die Expressionsrate der Referenzgene in beiden Gruppen von Bedeutung (siehe 3.2.3.4.10). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit für jedes qPCR-Experiment alle oben genannten Auswertungsaspekte analysiert und dargestellt. Die Expressionsstabilität der Kombination aus Referenzgenen ist Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der mit Hilfe der Referenzgene normalisierten Daten (Dheda, Huggett et al. 2005). Die Expressionsraten der Referenzgene (siehe 3.2.3.4.10) für die Vertreter der Kontrollprobengruppen wurden bezogen auf ihren Median relativ quantifiziert (siehe Gleichung 6) und die ermittelten Ergebnisse graphisch als Boxplot (Programm »SPSS 12.0 für Windows«) dargestellt. Boxplots präsentieren die ermittelten FC-Werte in einer Fünf-Punkte-Zusammenfassung; es werden der Median, die zwei Quantile sowie die beiden Extremwerte abgebildet. Als »Box« wird das durch die Quantile bestimmte Rechteck bezeichnet. Innerhalb der Box befinden sich 50% der FC-Werte. Unter dem oberen (75%-) Quantil befinden sich 75% der Werte, unter dem unteren (25%-) Quantil befinden sich 25% der Werte. Die Expressionsraten der Referenzgene in der Gruppe der Testproben wurden bezogen auf den Median der Expressionsraten der Referenzgene in der Kontrollprobengruppe relativ quantifiziert (siehe Gleichung 6)

und die ermittelten Ergebnisse ebenfalls graphisch als Boxplot dargestellt.

Die Analyse des Expressionsmusters der einzelnen Zielgene (GOI) erfolgte durch eine graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilungen bezogen auf die Variable »FC-Wert« in Balkendiagrammen mit Hilfe des Programms »Microsoft Office Excel 2003«.

Die Y-Achse stellt die Häufigkeitsverteilung der FC-Werte in % dar. Die X-Achse stellt die FC-Werte selbst dar. Diese können entweder unter 0,5 (verminderte Genexpression), über 2 (vermehrte Genexpression) oder zwischen 0,5 und 2 (keine Genregulation) liegen.

3.2.4 Proteinbiochemische Untersuchungen

3.2.4.1 Überblick

Der qualitative Nachweis der erfolgreichen Transfektion der HEK293T Zellen erfolgt durch eine immunologische Identifikation und Charakterisierung isolierter Proteine im Western Blot Verfahren (siehe Abbildung 3). Nach der Isolierung aus den Zellen werden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE, Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Blot) und anschließend immunologisch identifiziert.

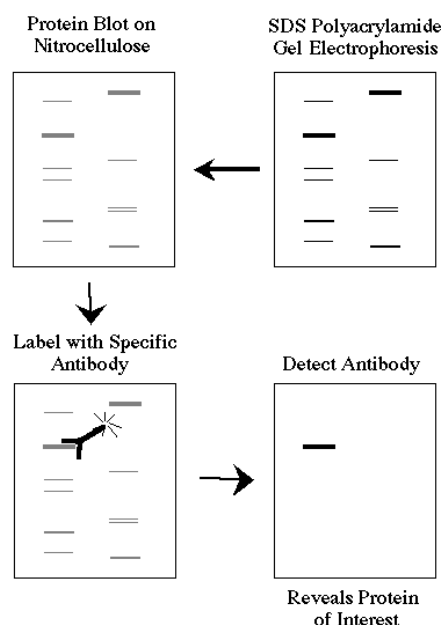


Abbildung 3 Schematische Darstellung von SDS-PAGE und Western Blot mit Immunodetektion

Das Prinzip der SDS-PAGE basiert auf der Proteinbindung und -denaturierung durch die Seife SDS. Im elektrischen Feld wandert der negativ geladene SDS-Protein-Komplex zum Pluspol.

Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. Bei dem sich anschließenden Blot-Verfahren werden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen (Rehm 1997).

Zur Immunodetektion der gesuchten transferierten Proteine wird die Membran in einem Zwei-Stufen-Verfahren mit spezifischen, enzymgekoppelten Antikörpern inkubiert, deren Proteinbindung mit Hilfe eines Färbeverfahrens sichtbar gemacht wird. Hierzu wird das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym »alkalische Phosphatase« (AP) verwendet, das sich mit Hilfe geeigneter Substrate durch Farbreaktion gut nachweisen lässt. Die Farbstoffe BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indorylphosphat/Nitroblau Tetrazolium) bilden ein Substrat für die alkalische Phosphatase (AP). Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten, gleichzeitig wird das NBT durch die alkalische Phosphatase reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag; gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettes Präzipitat. Überall dort, wo AP an die Proteine gebunden hat, entsteht somit eine blauviolette Färbung (siehe Abbildung 6).

3.2.4.2 Proteinisolierung aus HEK293T Zellen

Für die Proteinisolierung wurde jedes Well des Transfektionsansatzes mit Zellysepuffer (siehe 3.1.8) versetzt, in dem zuvor 1 Complete Mini-Proteaseinhibitor-Tablette (siehe 3.1.7) pro 7 ml Zellysepuffer gelöst wurde. Aus den Wells wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml DPBS (siehe 3.1.7) gespült.

Nach Absaugen des DPBS erfolgte der Auftrag von 500 µl Zellysepuffer mit Proteaseinhibitor. Daraufhin wurden die Zellen mit einer 1000 µl Pipettenspitze vom Boden der Zellkultur-Testplatten abgeschabt. Nach Abfüllen der Zellsuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße und Mischung auf dem Vortex Mixer (siehe 3.1.9) folgte eine 7-minütige Zentrifugation bei 14.000xg. Der Überstand wurde abgesaugt und entweder zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert oder bei -80 °C tiefgefroren.

3.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um bei den verschiedenen Proben jeweils die gleiche Proteinmenge in den Western Blot einsetzen zu können, wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und der jeweils identische Proteingehalt eingestellt. Zur Konzentrationsbestimmung diente das BCA Protein Assay Kit (siehe 3.1.5.2).

Das Reaktionsgemisch wurde nach Herstellerprotokoll angefertigt und 1 ml davon in jeweils ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pro Probe sowie in ein zusätzliches Gefäß für eine Leerwertprobe gefüllt. Anschließend wurden je 50 µl Proteinlysate in die vorgelegten Reaktionsgefäße pipettiert; der Leerwert bestand aus 50 µl Zellysepuffer. Nach 30-minütiger Inkubation im 37°C warmen Wasserbad erfolgte die photometrische Konzentrationsmessung im Photometer (siehe 3.1.9).

3.2.4.4 Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Um die Proteinfractionen in den Lysatproben elektrophoretisch auftrennen zu können, mussten diese zunächst vorbereitet werden. Hierzu wurden pro Probe 5 µl Proteinlysate, 2,5 µl NuPAGE™ LDS Sample Buffer (siehe 3.1.7), 1 µl NuPAGE™ Sample Reducing Agent (siehe 3.1.7) sowie 1,5 µl deionisiertes Wasser in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Währenddessen wurde die Gelelektrophoresekammer (siehe 3.1.9) aufgebaut, mit zwei Fertiggelen (NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel, siehe 3.1.7) bestückt und der Laufpuffer (siehe 3.1.8) vorbereitet. In einem Erlenmeyerkolben wurden dazu 50 ml NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (siehe 3.1.7) mit 950 ml Aqua dest. vermischt und davon 200 ml in die untere Pufferkammer der Western Blot Apparatur gegeben.

Weitere 200 ml gelöster Running Buffer wurden mit 500 µl NuPAGE™ Antioxidant versetzt und in die obere Pufferkammer gegeben. Anschließend wurden die Geltaschen der Fertiggele mit jeweils 15 µl vorbereiteter Proteinprobe bzw. 5 µl vorgefärbten Größenmarker (Page Ruler® Prestained Protein Ladder, siehe Abbildung 4 und 3.1.7) bestückt. Die Gelelektrophorese wurde 35 Minuten mit einer Spannung von 200 Volt (Voltgerät Power PAC 300, siehe 3.1.9) durchgeführt. Nach dem Lauf wurde ein Gel nach Coomassie gefärbt und ein Gel in den Proteintransfer eingesetzt.

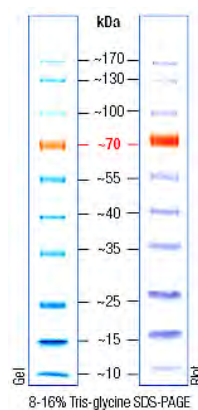


Abbildung 4 Gelelektrophoretische Auftrennung (links) und Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (rechts) der Page Ruler® Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH

3.2.4.5 Coomassie-Färbung (Gelfärbung)

Die Coomassie-Färbung ist ein gängiges Verfahren zur Visualisierung von Proteinen nach einer erfolgreichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine fixiert und positiv geladen. In dieser Form binden sie den Farbstoff. Zusätzliche Farbstoffmoleküle lagern sich aufgrund hydrophober Effekte an das Protein und den proteingebundenen Farbstoff an (Pingoud 1997).

In der vorliegenden Arbeit kam das Novex® Colloidal Blue Staining Kit (siehe 3.1.5.2) zum Einsatz. Die Färbelösung wurde nach Herstellerangaben angefertigt, die Gekassette geöffnet, das Gel in einem geeigneten Gefäß in die Lösung verbracht und mindestens drei bis maximal 12 Stunden auf einem Schwenker (siehe 3.1.9) bei circa 70 rpm und RT gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen, das Gel mit wenigstens 200 ml Aqua dest. für mindestens sieben Stunden auf dem Schwenker (s. o.) entfärbt und mit Hilfe des Novex® DryEase Mini-Gel Drying System (siehe 3.1.5.2) nach standardisiertem Protokoll getrocknet.

3.2.4.6 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Western Blot)

Zur Vorbereitung auf den Proteintransfer wurden zunächst 1000 ml Transferpuffer (siehe 3.1.8) angesetzt. Hierzu mussten in einem Erlenmeyerkolben 100 ml Methanol, 50 ml NuPAGE™ Transfer Buffer (20X) sowie 1 ml NuPAGE™ Antioxidant mit 850 ml Aqua dest. vermengt werden (siehe 3.1.8).

Die Proteintransferkammer (siehe 3.1.9) wurde aufgebaut und das »Blot-Modul« gemäß den Herstellerangaben mit Filterpapier, Kunststoff-Vlies, Gel und einer Nitrocellulosemembran (siehe 3.1.7) versehen (siehe Abbildung 5).

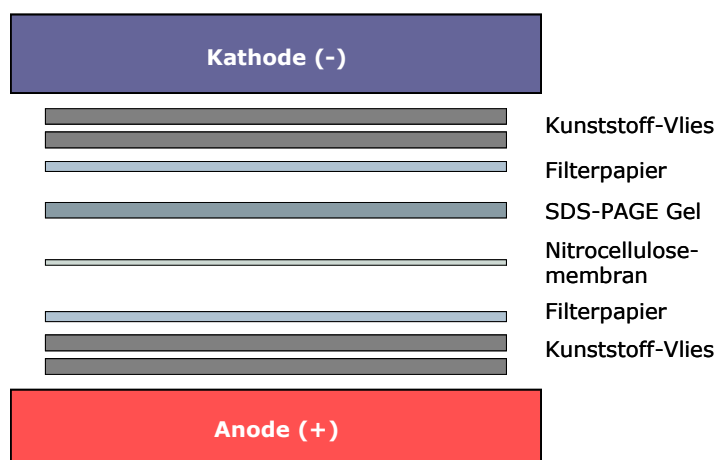


Abbildung 5 Schichtung von Gel und Nitrocellulosemembran in der Proteintransferkammer

Weiterhin wurde das Blot-Modul mit Transferpuffer (s. o.) gefüllt und die äußere Pufferkammer mit 650 ml Aqua dest. beladen. Der Western Blot wurde eine Stunde mit einer Stromstärke von 170 mA durchgeführt.

3.2.4.7 Ponceau S-Färbung (Membranfärbung)

Im Anschluss an den Western Blot wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S gefärbt, um Aussagen über den Erfolg des Proteintransfers treffen zu können.

Dazu wurde die Membran 5 Minuten in Ponceau S Staining Solution 0,1 % (siehe 3.1.7) inkubiert und anschließend unter fließendem Aqua dest. so lange entfärbt, bis lediglich die Proteinbanden sichtbar waren. Nach einer Fotodokumentation wurde die Membran mit Aqua dest. komplett entfärbt und in PBS (»Phosphate Buffered Saline«, pH 7,4 siehe 3.1.8) bei 4°C aufbewahrt oder unmittelbar im Antigen-Antikörper-Nachweis eingesetzt.

3.2.4.8 Antigen-Antikörper-Nachweis (Immunoblotting)

Nach der Ponceau S-Färbung wurde die Membran in der vorliegenden Arbeit mindestens eine Stunde in einer 1:10-Verdünnung Roti®-Block 10X Konzentrat mit PBS (s. o.) inkubiert. Nach zwei 5-minütigen Waschvorgängen mit PBS/Tween 20 (siehe 3.1.8) zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1,5 Stunden in 10 ml einer 1:1000-Antikörperverdünnung bei 70 rpm auf einem Schwenker (siehe 3.1.9) bewegt. Diese Verdünnung wurde aus 10 µl Antikörper-Stammlösung (siehe 3.1.6) und einer 1:100-Verdünnung von Roti®-Block 10X Konzentrat mit PBS (s. o.) hergestellt. Anschließend wurde die Membran zweimal fünf Minuten in PBS/Tween 20 (s. o.) inkubiert und zur Detektion gebundener Antikörper mit dem Färbesubstrat BCIP/NBT (siehe 3.1.5.2) versetzt. Nach 15 bis 30 Minuten wurde die Farbreaktion (siehe Abbildung 6) durch kaltes Leitungswasser gestoppt und die Membran luftgetrocknet. Die blau gefärbten Proteinbanden wurden mit dem Größenmarker auf der Membran verglichen und somit der Erfolg des Verfahrens überprüft.

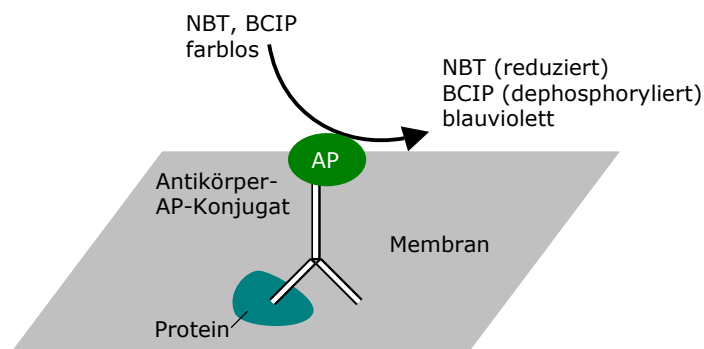


Abbildung 6 Prinzip des Immunoblotting mit Hilfe des BCIP/NBT-Kits (siehe 3.1.5.2)